

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

17.07.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 7月16日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第203406号

REC'D 04 SEP 2000

出 願 人

Applicant (s):

旭化成工業株式会社

4

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造

【書類名】 特許願
 【整理番号】 B99037
 【提出日】 平成11年 7月16日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 G01N 21/00
 【発明者】

【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 北口 暢哉

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 家村 直子

【特許出願人】

【識別番号】 000000033

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代表者】 山本 一元

【代理人】

【識別番号】 100066980

【弁理士】

【氏名又は名称】 森 哲也

【選任した代理人】

【識別番号】 100075579

【弁理士】

【氏名又は名称】 内藤 嘉昭

【選任した代理人】

【識別番号】 100103850

【弁理士】

【氏名又は名称】 崔 秀▲てつ▼

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001638

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9902179

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヘモグロビン測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血液試料中のヘモグロビンを検出またはその濃度の測定を行う方法であって、前記血液試料と測定試薬とを混合し溶血させて測定試料を調製する試料調製工程と、前記測定試料に励起光を照射して、その結果生じる部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する光熱変換検出工程と、を備えることを特徴とするヘモグロビン測定方法。

【請求項 2】 前記物理量変化が屈折率変化であり、前記光熱変換検出工程では、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出用のプローブ光を入射させ、該熱レンズにより生じる該プローブ光の変化を測定することを特徴とする請求項 1 記載のヘモグロビン測定方法。

【請求項 3】 前記励起光の波長が 6 1 0 n m から 6 5 0 n m の範囲であり、かつ前記プローブ光の波長が前記励起光よりも長波長であることを特徴とする請求項 2 記載のヘモグロビン測定方法。

【請求項 4】 前記励起光の波長が 6 2 0 n m から 6 4 0 n m の範囲であり、かつ前記プローブ光の波長が前記励起光よりも長波長であることを特徴とする請求項 2 記載のヘモグロビン測定方法。

【請求項 5】 前記血液試料と前記測定試薬とをキャピラリを有するマイクロチップに装入し、前記試料調製工程と前記光熱変換検出工程とを前記マイクロチップのキャピラリ内で行うことを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のヘモグロビン測定方法。

【請求項 6】 前記測定試薬が、赤血球を溶血する濃度の中性界面活性剤と、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する濃度の酸化剤と、p H を 5 から 7 の範囲で維持する濃度の緩衝剤と、を含むことを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のヘモグロビン測定方法。

【請求項 7】 前記測定試薬がシアニドを含有しないことを特徴とする請求項 6 記載のヘモグロビン測定方法。

【請求項 8】 前記血液試料と前記測定試薬との混合比が、1 : 1 から 1 :

250の範囲であることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のヘモグロビン測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微量の血液試料中のヘモグロビンを簡便に測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

血液試料中のヘモグロビンを測定することは、貧血症や多血症等の臨床診断において重要である。

従来のヘモグロビンの測定方法としては、シアンメトヘモグロビン法、SLS法、アザイドメトヘモグロビン法、アルカリヘマチン法等があるが、いずれも吸光度法により測定する方法である。

【0003】

全血を溶血させヘモグロビンを吸光度で測定する方法としては、シアンメトヘモグロビン法が多く用いられており、国際基準法としても定められている。シアンメトヘモグロビン法によるヘモグロビンの測定方法を簡単に説明する。まず、血液試料にノニオン性界面活性剤等を含む赤血球溶解剤を添加し、赤血球中に含まれるヘモグロビンを溶出する。次に、溶出したヘモグロビンをフェリシアン化カリウム等の酸化剤により酸化し、メトヘモグロビンに転化させる。そして、シアンイオンを添加することによって、メトヘモグロビンをシアンメトヘモグロビンとし、安定なヘモグロビン測定試料を調製する。

【0004】

このシアンメトヘモグロビン試料は540nmに吸収を持つため、540nmの吸光度を測定することでヘモグロビンを定量することができる。しかし、シアンメトヘモグロビンは540nmに吸収を持つものの、600nm以上には吸収を持たない。したがって、現在安価に入手可能な半導体レーザーが600nm以上の長波長であることを考えると、安価な半導体レーザーを励起光または吸収光源として用いてヘモグロビンの測定を行うには、シアンメトヘモグロビン法は好

適ではない。

【0005】

その上、この方法では、測定試薬中に毒物であるシアン化カリウムを含有するので、測定試薬の取り扱いに危険が伴い、さらに、測定後の廃液は次亜塩素酸ナトリウム等を用いてシアニドを分解した後に廃棄する必要があり、廃棄処理が煩雑である。

このような毒物の問題を解決する方法として、中性緩衝液中にドデシル硫酸ナトリウム、またはラウリル硫酸ナトリウム（SLS）（アニオン性界面活性剤）およびトリトンX-100（商品名）を含有するヘモグロビン測定試薬が、クリニカル・バイオケミストリー15巻83（1982）に開示されている。この方法では、赤血球をSLSおよびトリトンX-100の働きで溶解し、溶出したヘモグロビンを、SLSと酸素との働きでメトヘモグロビンとすると同時にSLSヘモグロビンに転化する。このSLSヘモグロビンは540nmに吸収を持つため、540nmの吸光度を測定することで、ヘモグロビンを定量することができる。

【0006】

この方法では、測定試薬中にシアニドを含まないので、煩雑な廃液処理は不要である。しかし、SLSヘモグロビンは、シアンメトヘモグロビンと同様に540nmの吸収を持つものの、600nm以上の吸収は持たない。そのため、600nm以上の波長を持つ安価な半導体レーザーを光源とする光学的測定方法には適用できない。

【0007】

従来の吸光度法を用いたヘモグロビン測定方法はいずれも、デスクトップからベンチトップ程度の比較的大型の自動検査機に適合するよう改良されてきたものである。そのため、測定用のキュベット（セル）は数百 μ lから1ml程度の大きなものであり、測定に必要な光路長を2~10mm程度に取ることが可能なため、吸光度法で検出することが可能であった。

【0008】

しかしながら、最近では、医療診断に必要な測定を患者近傍で行うベッドサイド

診断、すなわち point of care (POC) 分析に適した検出法や装置の開発が重要視されつつある。このような POC 分析においては、検体（血液）の必要量および測定後の廃棄物の量が微量で、安価で簡便かつ短時間で測定できることが要求されている。

【0009】

微量な試料でも分析可能な測定方法として、 μ TAS (micro total analysis system) の研究 (特開平 2-245655 号公報参照) が進められている。この μ TAS は、10 cm から数 cm 角程度以下のガラス、シリコン、有機ポリマー等のチップの表面に、深さ及び幅が数 μ m から数百 μ m 程度の溝 (キャピラリー) を設け、その中で試料の分離、反応さらには測定を行うものである。このようなマイクロチップを用いた場合には、検体量、分析に必要な試薬量、分析に用いた消耗品等の廃棄物、廃液の量がいずれも少なくて済む上、分析に必要な時間もおおむね短時間で済むという利点がある。

【0010】

しかしながら、上記のような溝を有するマイクロチップを使用した場合は、光路長を数 μ m から数百 μ m 程度しか取れないので、吸光度法ではヘモグロビンの測定が困難である。なぜなら、吸光度法は原理的に、入射光と透過光との比を検出するものであるため、精度のよい結果を得るためには光路長を長くとる必要があるからである。

【0011】

そのため、マイクロチップ中の溝に、液の流れ方向 (溝の長手方向) に対し垂直に光をあてるのではなく、液の流れ方向に沿って光を当てるという工夫もされているが (ヘモグロビン測定ではないが、一般的な溝中の吸光度測定の例としては、例えば、特開平 8-304339 号公報がある)、平面チップに形成された溝 (キャピラリー) の場合、液の流れ方向での検出は容易ではなく、また、長光路を得るためマイクロチップおよび検出部の構造が複雑となる欠点を有する。

【0012】

また、微量成分の検出法としては、蛍光法や発光法も知られている。しかし、ヘモグロビンの測定の場合は、ヘモグロビンに直接または間接に酵素や蛍光色素

で標識した抗体などを結合させる必要があるので、検出のための反応がきわめて複雑になる。

一方、微量成分の別の検出法として、励起光で液体試料中の所定成分を励起していわゆる熱レンズを形成させ、プローブ光でその熱レンズの変化を検出する光熱変換検出法（熱レンズ検出法）が以前から知られている（特開昭60-174933号公報、A. C. Boccara et al., Appl. Phys. Lett. 36, 130, 1980）。

【0013】

まず、光熱変換現象に基づき形成される熱レンズを用いた検出法の原理を説明する。溶液に溶解している被測定物質が吸収する波長の光（励起光）を被測定溶液に照射する。すると、被測定物質は励起光により励起され、熱を発生する（光熱変換効果）。ここで、溶液中に存在する被測定物質以外の夾雑物が、この励起光を吸収しないように、励起光の波長を選択することが重要である。発生した熱は、励起光が照射された部分の近傍の溶媒に伝わり、局所的な密度変化、ひいては屈折率変化を引き起こす。このため、励起光を吸収する物質の存在下では、励起光を照射した部分はあたかも凹レンズが形成されたようになる。この凹レンズが形成された部分に、励起光の波長とは異なるプローブ光を照射する。プローブ光は熱レンズにより屈折するため、プローブ光を捕捉する受光素子が捉えるプローブ光の光量は、熱レンズが形成されると低下する。光熱変換効果の度合いは被測定物質の濃度に応じて変化するので、前記光量の低下度合いを測定することにより被測定物質の定量を行うことができる。

【0014】

上記のように熱レンズ検出法では、励起光とプローブ光との通常2種の光源（レーザー等）が必要である。ArレーザーとHe-Neレーザーとを用いて光熱変換検出法（熱レンズ検出法）で検出を行う例として、溝が刻まれたチップの外部からポンプにより送液するキャピラリー分析装置に適用した例もある（ぶんせき No. 4, 280-284, 1997、M. Harada, et. al., Anal. Chem. Vol. 65, 2938-2940, 1993、川西, 他 日本分析化学会第44年会講演要旨集, p119, 1995）。

【0015】

さらに、この熱レンズ検出法を用いて、白血病白血球中の異常ヘモグロビン産生を検出した例が知られている (Wu, Kitamori, Sawada, Ana. Chem. 63, 217-219, 1991、北森, 澤田, ぶんせき 3, 178-187, 1994)。この方法は、顕微鏡検鏡下でスライドガラス上で白血球細胞を一つ分離し、細胞を壊すことなく、そのままヘモグロビンの420nmの吸収をXeランプで励起する。そして、He-Neレーザーをプローブ光として、白血球外の上部空間に形成される熱レンズを検出することにより、白血病で異常になった白血球が産生するヘモグロビンを測定している。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、血液中のヘモグロビン濃度を求めるためには、所定体積の血液を溶血させ、その中に存在する全赤血球由来のヘモグロビンを測定することが必要であるので、上記の熱レンズ検出法を用いた方法では血液中のヘモグロビン濃度を測定することはできない。

【0017】

以上述べたように、全血中のヘモグロビン濃度を、極微量の血液試料から、600nm以上の波長を持つレーザーを用いて測定する方法は知られていない。

本発明は、POC分析に適用するのに好適であって、600nm以上の波長を持つレーザーを用いて、シアニドを含む測定試薬を使用することなく、微量の血液試料中のヘモグロビンを測定する方法を提供することを目的とする。

【0018】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を行った結果、上記目的を達成し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明に係る請求項1記載のヘモグロビン測定方法は、血液試料中のヘモグロビンを検出またはその濃度の測定を行う方法であって、前記血液試料と測定試薬とを混合し溶血させて測定試料を調製する試料調製工程と、前記測定試料に励起光を照射して、その結果生じる部分的な温度変化に伴う物理量変化を

測定する光熱変換検出工程と、を備えることを特徴とする。

【0019】

また、本発明に係る請求項2記載のヘモグロビン測定方法は、請求項1記載のヘモグロビン測定方法において、前記物理量変化が屈折率変化であり、前記光熱変換検出工程では、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出用のプローブ光を入射させ、該熱レンズにより生じる該プローブ光の変化を測定することを特徴とする。

【0020】

さらに、本発明に係る請求項3記載のヘモグロビン測定方法は、請求項2記載のヘモグロビン測定方法において、前記励起光の波長が610nmから650nmの範囲であり、かつ前記プローブ光の波長が前記励起光よりも長波長であることを特徴とする。

さらに、本発明に係る請求項4記載のヘモグロビン測定方法は、請求項2記載のヘモグロビン測定方法において、前記励起光の波長が620nmから640nmの範囲であり、かつ前記プローブ光の波長が前記励起光よりも長波長であることを特徴とする。

【0021】

さらに、本発明に係る請求項5記載のヘモグロビン測定方法は、請求項1～4のいずれかに記載のヘモグロビン測定方法において、前記血液試料と前記測定試薬とをキャピラリを有するマイクロチップに装入し、前記試料調製工程と前記光熱変換検出工程とを前記マイクロチップのキャピラリ内で行うことを特徴とする。

【0022】

さらに、本発明に係る請求項6記載のヘモグロビン測定方法は、請求項1～5のいずれかに記載のヘモグロビン測定方法において、前記測定試薬が、赤血球を溶血する濃度の中性界面活性剤と、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する濃度の酸化剤と、pHを5から7の範囲で維持する濃度の緩衝剤と、を含むことを特徴とする。

【0023】

さらに、本発明に係る請求項7記載のヘモグロビン測定方法は、請求項6記載のヘモグロビン測定方法において、前記測定試薬がシアニドを含有しないことを特徴とする。

さらに、本発明に係る請求項8記載のヘモグロビン測定方法は、請求項1～7のいずれかに記載のヘモグロビン測定方法において、前記血液試料と前記測定試薬との混合比が、1:1から1:250の範囲であることを特徴とする。

【0024】

以下に、本発明を詳細に説明する。

(ヘモグロビンの吸収波長について)

血液中のほとんどのヘモグロビンは、2価の鉄に酸素が結合したオキシヘモグロビン、および酸素を離したデオキシヘモグロビンの状態で存在し、ごく一部が酸素を結合することができない3価の鉄に酸化されたメトヘモグロビンになっている。

【0025】

オキシヘモグロビンの吸収は540nmと577nmとにあり、デオキシヘモグロビンは555nmに吸収がある。また、メトヘモグロビンはpHによって吸収が変化し、酸性では630nm、強塩基性ではより短波長に吸収があり、赤味が増す。

このように血液中のヘモグロビンは、オキシヘモグロビン、デオキシヘモグロビンだけでも3つの吸収を持つため、このままでは全ヘモグロビンの定量は難しい。そのため、従来の技術では、一旦、血液試料を溶血させ、それにフェリシアニ化カリウムのような酸化剤を添加することで、全てのヘモグロビンをオキシヘモグロビンに酸化する。生成したオキシヘモグロビンは不安定なので、青酸カリ(KCN)等を添加してCNイオンをヘム鉄に配位させ、540nmに吸収を持つ安定なシアンメトヘモグロビンに誘導してから、540nmの吸光度を測定している。

【0026】

しかしながら、先述したように、マイクロチップでヘモグロビンの定量を行う場合は、吸光度法での測定は困難で、熱レンズ検出法で検出することが好ましい

。POC分析での使用を考えると、高価なガスレーザーではなく、安価な半導体レーザーが使用できる波長でヘモグロビンを励起し、熱レンズの変化を検出することが好ましい。現状での安価な半導体レーザーの波長は、600nm以上であるので、それ以上の吸収をもつ状態に血液中の全てのヘモグロビンを誘導する必要がある。

【0027】

本発明者らは、熱レンズ検出法の必要条件である、励起光照射下のメトヘモグロビンの吸収の安定性を検討した。すなわち、熱レンズ検出法においてマイクロチップの溝に照射する励起光と同一波長で、その測定対象液（反応後の液）を光路長を1cmと長くとしたキュベット中に入れて、吸光度の測定を行った。もし吸光度が不安定であれば、原理的に、熱レンズ検出法での検出も不安定となるため、この吸光度で安定かつ高精度で測定できることが、熱レンズ検出法のための必要条件となる。

【0028】

後述する実験例1に示すように、青酸カリを添加しないで、前述したように、630nmの吸収を持つメトヘモグロビンまで酸化して、これに633nmのレーザー光を照射して、その吸光度変化が容量依存性があるかを検討した。その結果、630nmの波長でもヘモグロビンを定量することが可能であった。

（血液試料と測定試薬の混合比について）

しかしながら、本発明者らの検討により、血液試料とヘモグロビン測定試薬とを混合して測定試料とする際に、通常の混合比（1：250以上）では、熱レンズ検出法による出力が時間に対してやや不安定で、経時的に少しずつ減少していくことがわかった。例えば、1：250では、20分で630nmの吸光度が8.5%減少するにとどまるが、1：415では16%の減少、1：1250では31%もの減少となり、臨床診断には適用しにくい精度となる。

【0029】

比較的低い精度でのヘモグロビン測定なら、これでも測定は可能だが、精度の高い定量を行うには、改善が必要であった。本発明者らは、種々検討した結果、血液試料と後述する組成を持つ測定試薬との混合比を、1：1から1：250以

下にすれば、この熱レンズ検出法による出力の経時変化（減少）が避けられることを見出した。

【0030】

さらに、マイクロチップ中でヘモグロビン測定を行う場合は、血液試料と測定試薬との混合比は1 : 250を越える場合、例えば1 : 500等の場合はマイクロチップ内で混合することは難しい。なぜなら、まず、血液試料が微量でも、大量の測定試薬が必要なため、マイクロチップ内の測定試薬リザーバーが大きくなりすぎる欠点がある。また、1 : 500という混合は、マイクロチップの細いキャピラリー中で均一に混合することは困難で、均一な混合を実現するための特殊な流路構造（邪魔板、攪拌など）や、著しく長い流路等が必要となる。その点からも、混合比を小さくすることは好ましい。

【0031】

本発明における血液試料と測定試薬との混合比は、1 : 1から1 : 250が好ましく、より好ましくは1 : 1から1 : 50、さらに好ましくは1 : 1から1 : 10である。この混合比が1 : 1より小さいと、例えば1 : 0.1などになると、溶血に十分な測定試薬、浸透圧を与えることが難しくなる。

（測定試薬の組成について）

本発明のヘモグロビン測定方法において使用される測定試薬中に使用しうる中性界面活性剤は、全赤血球を溶解しうるに十分な界面活性能があれば、特に限定されない。中性界面活性剤の種類としては、具体的には、6-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（例えば、シグマ社のトリトンX-100）等のポリオキシエチレンエーテル類や、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（例えば、ICI社やシグマ社のツイーン20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイト（例えば、ICI社、シグマ社等のツイーン80）等のポリオキシエチレンソルビタン類（ツイーン）などが用いられる。また、SLS等のアニオン性界面活性剤や、CTAB（セチルトリブチルアンモニウムブロマイド）等のカチオン性界面活性剤なども、用いることができる場合もある。溶血時のpH変化を来さない程度で有れば、これらのイオン性界面活性剤も使用可能である。界面活性剤の詳細なリストは、成書に記載されている。例えば、Gower社の

Handbook of Surfactant 第2版, 第1巻及び第2巻 (1997年) などである。

【0032】

本発明における測定試薬は、血液試料中の赤血球をすべて溶血させる量を添加すればよい。本発明における測定試薬は、1:1~1:250の比で血液試料に添加され、その結果、得られる混合物中の界面活性剤の濃度は、0.5から1.

1重量%で有ることが好ましく、より好ましくは0.7から0.9重量%、さらに好ましくは0.8重量%である。

【0033】

また、測定試薬中に使用しうる酸化剤は、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化するもので有れば特に限定されないが、好ましくはフェリシアン化カリウムである。本測定試薬は全ヘモグロビンを酸化するのに十分な量を、血液試料に添加する。後述の実験例1に酸化剤濃度の検討結果を示したように、熱レンズ検出法の必要条件であるメトヘモグロビンの酸化は、血液試料1 μ lに対し酸化剤が50~10000nmol (絶対量) であることが好ましく、より好ましくは、血液試料1 μ lに対し酸化剤が100~4000nmol (絶対量) である。

【0034】

また、本測定試薬のpH値は、メトヘモグロビンの吸収を630nmに保つため、弱酸性~弱アルカリ性の範囲であることが好ましい。実験例1と同様に、熱レンズ検出法の必要条件である、励起光照射下のメトヘモグロビンの吸収の安定性を検討した実験例2に示したように、そのpHは4~8であることが好ましく、より好ましくはpH5.0から7.0であり、さらに好ましくはpH5.7から6.3である。上記のようなpH値を維持するため、PBS等のリン酸バッファーや種々のグッドバッファーなど、通常の緩衝剤が使用される。

(励起光およびプローブ光について)

本発明者等が、励起光に633nmの波長を持つHe-Neレーザーを用い、プローブ光に488nmの波長を持つArレーザーを用いて、熱レンズ検出法によるヘモグロビンの測定を行ったところ、参考例に記したように、熱レンズ検出法による出力が異常に大きく、かつ経時的に増加するという現象が見られた。こ

の励起光とプローブ光との組み合わせは、コレステロールなどの生化学項目をD A O Sなどの色素に誘導して測定した場合には、問題なく熱レンズ検出法による出力が検出でき、定量できた組み合わせである。例えば、特願平10-181586号明細書（「混合分析装置および混合分析方法」）、特願平10-181587号明細書（「キャピラリ光熱変換分析装置」）、特願平10-167603号明細書（「分析装置」）、国際出願PCT/JP99/03158号明細書（「分析装置」）等がある（ただし、これら4件は本出願時点では公開されていない）。

【0035】

本発明者らが種々検討した結果、488nmおよび633nmの両方の光がメトヘモグロビンに照射されると、光反応が起こり異常値となることがわかった。そこで、プローブ光を励起光より長波長の、メトヘモグロビンが吸収しない波長であるレーザーに変えたところ、正常な熱レンズ検出法による出力が得られ、ヘモグロビンの定量が可能であった。

【0036】

本発明で用いる励起光の光源は、メトヘモグロビンの630nmの吸収帯を励起できる波長を有し、熱レンズを形成させるのに十分な出力を備えたものが必要である。励起光の波長は、メトヘモグロビンの吸収から、610nm～650nmが好ましく、より好ましくは、630nm±10nmである。励起光源は、630nm付近に励起に必要な光度を持つものなら、特に限定されない。

【0037】

例えば、キセノンランプなどから必要とする波長の光をプリズムを用いて取り出してもよいし、検出対象物質を励起することが可能な波長を有するレーザーでもよい。レーザーとしては633nmのHe-Neレーザーなども用いられるが、半導体レーザーを用いると検出装置が小さくなり、POC分析の用途に適する

。半導体レーザーとしては、東芝社製TOLD9450MC等の650nmのものも用いられるが、より好ましい励起光源としては、シャープ社製LT050MSや、三洋電機社製DL-3088-011、DL4038-025等の635nmの半導体レーザーが挙げられる。

【0038】

プローブ光の波長は、前述したように600nmより長波長が好ましく、より好ましくは励起光の波長の $630\text{nm} \pm 20\text{nm}$ よりも長波長のものである。1064nmのYAGレーザーや、900~1200nmに100本程度の発振線をもつ炭酸ガスレーザー等も使用できるが、日本科学エンジニアリング社製LD T7830や三洋電機社製DL-4034-151等の780nmの発光をする半導体レーザーがより好ましい。三洋電機社製DL-7032-001やシャープ社製LT015PDや日立社製HL8325G等の830nmの半導体レーザーも、好ましく使用できる。なお、励起光、プローブ光ともにキャピラリ付近に焦点を結ぶようにするために、集光レンズが必要である。

【0039】

熱レンズによるプローブ光の変化は、フォトダイオード、CCDカメラ、光電子増倍管などで捉えられる。特に、フォトダイオードが検出装置の小型化には適している。

励起光はチョッパー等で0.1~1m秒程度のパルス光にされ、そのチョッパーと同調するロックインアンプなどで、プローブ光の変化のみを取り出す。ロックインアンプは、単機能の半導体素子などで簡略化が可能である。また、励起光のパルス化は、半導体レーザーを電氣的に変調させてもよい。また、プローブ光の検出の際、一般にはロックインアンプを用いるが、特開平9-229883に開示される暗視野型光熱変換分光分析装置の方法を用いて、遮蔽板でポンプ光およびプローブ光の光軸付近の光束を遮蔽し、熱レンズによって発散されたプローブ光のみを検出する手段をとってもよい。

【0040】

チョッパーによりパルス光となった励起光によって形成される熱レンズの変化を、プローブ光で検出する際に、プローブ光中の振動成分（励起光のパルスと同一周波数）のみを検出することにより、散乱などによって光の絶対量 I が減少しても、光量 I に対する振動成分 i 比（ i/I ）は不変となり、安定して正しい値を得ることが可能となる。

（マイクロチップについて）

本発明のヘモグロビン測定方法において使用されるマイクロチップは、その内部に血液試料や測定試薬等が流れるキャピラリを有していれば、その構成等は特に限定されるものではない。

【0041】

例えば、以下のような構成は本発明における好ましい形態の一つである。すなわち、マイクロチップが一对の平板状部材から構成されており、その少なくとも一方は表面に液体が流れる溝を有する平板状部材で、該平板状部材の前記溝を内側にして2つの平板状部材を張り合わせることにより、内部にキャピラリを形成するような構成である。

【0042】

このようなマイクロチップは、シリコンやガラス等の無機材料や有機ポリマーで製造することができる。ただし、熱レンズ検出法での検出部分は、励起光及びプローブ光に対して透明であることが必要である。

シリコンやガラスの場合は、ガラス、石英もしくはSi基板にエッチング保護膜(Cr等)を真空蒸着等の方法で数千オングストロームの厚さに製膜を行い、その上にパターニングレジストをスピナーを用いて塗布する。その後、フォトリソ用マスクを用いて、紫外光にてレジストを露光、続いて現像(未硬化部分を溶剤で除去)し所望の形状にパターニングする。次に、パターニングされたレジストをエッチングマスクとして、エッチング保護膜をフェリシアン化カリウム水溶液等で溶解除去しパターニングする。続いて、パターニングされたレジストおよびエッチング保護膜をマスクとして、基板を例えば弗酸水溶液にてエッチングして溝を形成する。その後、レジストおよび保護膜をエッチング除去する。また、上記基板とは別に、レーザーや超音波加工等の方法で貫通孔を開けたガラス等の基板を準備する。最後に、溝加工された基板と貫通孔を開けられた基板とを、溝を内側にして張り合わせ、例えば、真空炉中にて加熱(ガラス基板同士の場合には、600度程度に数時間加熱)した後、自然冷却することで融着しマイクロチップを作ることができる。

【0043】

前記平板状部材を有機ポリマーで製造する場合は、光学的検出を行う場合は、

検出に用いられる波長の光に対して透明性を有する樹脂を使用する。例えば、光熱変換検出法による検出の場合、ASTM D1003で測定される樹脂の光線透過率において、使用できる励起光およびプローブ光の波長を考慮すると、600 nm～800 nmの波長範囲で、それぞれ光の透過率が80%以上、好ましくは90%以上のものが良好に使用できる。

【0044】

上記の光線透過率は、マイクロチップの表面での反射率及び有機ポリマー基材そのものによる吸収率の総和を、100%から減じた値である。マイクロチップの表面などで散乱される光は、有機ポリマーに対しては何の効果も発揮しないのに対し、有機ポリマー基材によって吸収される光は、有機ポリマーに対しても熱を発生させる効果を有する。よって、光が有機ポリマーを通過する際に熱レンズのような効果が生じ、熱レンズ検出法による出力のバックグラウンドとなるため、測定の誤差となる。そのため、実際のマイクロチップ作成に先立って有機ポリマー材の評価を行い、実際の熱レンズ検出法に影響を及ぼさない透過率の範囲を決定する必要がある。

【0045】

吸光度で検出する場合は、有機ポリマーによって10%程度吸収されたとしても、全体の光量を90%に低下させるにすぎず、検出感度には大きな影響を及ぼさない。しかしながら、光熱変換検出法の場合は、10%以下の吸収であっても、有機ポリマー製のマイクロチップ中に形成される熱レンズのため、測定に大きな影響を与える。特に、測定対象物の濃度が低く、且つキャピラリーが細い（溝が浅い）といった、測定に高感度を要求される場合には、1%以下の吸収であっても、ときには0.5%以下のわずかな吸収であっても、キャピラリー中の物質の測定に悪影響を与えるようなバックグラウンドの原因となる。

【0046】

1 cmのキュベットでの吸光度が0.1程度の物質（液体）の測定を、仮に50 μ mのキャピラリーを備えた有機ポリマー製マイクロチップを用いて行ったとすると（すなわち、光路長が50 μ m）、1 cmの光路長での吸光度0.1は、50 μ mのキャピラリーに対しての吸収率としては0.103%に相当する。有機ポ

リマー製マイクロチップのポリマー部分による吸収（熱レンズの形成）を、この10倍まで許容するとすると、吸収率は1%、2倍までとすると吸収率は0.2%となる。

【0047】

つまり、1cmの光路長の場合の吸光度が0.1程度の測定を、本発明の測定方法で行うには、マイクロチップを形成する有機ポリマーによる光の吸収が1%以下、より好ましくは0.2%以下であることが望ましいということになる。

ただし、この値は、測定対象物の濃度、キャピラリの細さの違い等により変化し得る。例えば、測定対象物の濃度を高くすることによって、1cmのキュベットでの吸光度を0.5程度まで上げた場合は、50 μ mのキャピラリに対する吸収率は0.342%に相当し、有機ポリマー製マイクロチップによる吸収（熱レンズの形成）をこの10倍まで許容するとすると、有機ポリマー製マイクロチップによる吸収率はおよそ3.5%、2倍までとすると吸収率は1%弱となる。

【0048】

また、前記平板状部材に溝を設ける際の加工性も、樹脂の種類を選択において重要な要素である。加工性の面から良好に使用できるのは、一般の熔融加工可能な熱可塑性樹脂やUV硬化によって得られた樹脂があげられる。特に良好に使用できるのは、表面に溝を有する平板状部材を大量に且つ安価に成形できる点で、熔融加工可能な熱可塑性樹脂である。その中でも、非結晶性熱可塑性樹脂、非結晶性樹脂が主成分の熱可塑性ポリマーアロイ、あるいは結晶化度が低い一部の結晶性熱可塑性樹脂が好適である。

【0049】

また、血液との親和性、特に凝集、凝固、及び血小板の活性化などが起こらないことも、好ましい素材の条件の一つである。

以上のような光の透過性と加工性とを満足し、特に良好に使用できるのは、具体的には、ポリスチレン、スチレン-アクリロニトリル共重合体等のスチレン系樹脂、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、メチルメタクリレート-スチレン共重合体等のメタクリル樹脂、ポリカーボネート（PC）、ポリスルホン（PS）、ポリエーテルスルホン、ポリエーテルイミド、ポリアリレート、ポリメチ

ルペンテン等である。1, 3-シクロヘキサジエン系重合体も好適に用いられる。ホモポリマーとして使用することも可能であるが、共重合体として用いる場合は、1, 3-ブタジエン、イソプレン、1, 3-ペンタジエン、1, 3-ヘキサジエン等の鎖状共役ジエン系モノマー、スチレン、 α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、1, 3-ジメチルスチレン、ビニルナフタレン、ビニルスチレン等のビニル芳香族系モノマー、メタクリル酸メチル、アクリル酸メチル、アクリロニトリル、メチルビニルケトン、 α -シアノアクリル酸メチル等の極性ビニルモノマー若しくはエチレンオキシド、プロピレンオキシド、環状ラクトン、環状ラクタム、環状シロキサン等の極性モノマー、またはエチレン、 α -オレフィン系モノマーとの共重合体が挙げられる。この場合の共重合比は重量比で1, 3-シクロヘキサジエンモノマー/コモノマー=75/25~100/0が好ましい。光透過性の高いシクロヘキサジエン系ポリマーについては、特願平9-277045号明細書や特願平10-287007号明細書中に詳細に記述されている。該ポリマーは、素材として、200nm以上の波長の吸収はほとんどない。

【0050】

前記のような、溝を有する有機ポリマー製の平板状部材は、平板からの切削加工やレーザー等によるエッチング加工、型内でのモノマーやマクロモノマーのUV硬化や熱硬化、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工等の方法により成形できる。良好に使用できる成形加工法としては、前記平板状部材を大量に且つ安価に成形加工できることから、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工があげられる。より良好に使用できるのは、金型を用いた熱可塑性樹脂の射出成形法および/または圧縮成形法、エンボス成形法である。

【0051】

特に、樹脂の金型キャビティへの充填工程中に、金型に接する樹脂表面の固化温度を低下させつつ射出成形する射出成形法（特開平10-128783号公報、特願平10-46665号明細書に開示されている）は、生産性良く成形精度の高い微細な溝を有する有機ポリマー製の平板状部材を成形することができる。この射出成形方法の具体例としては、キャビティ内に炭酸ガスを満たしておき射出成形する方法があげられる。この場合の炭酸ガスの圧力は、10MPa以下

、より好ましくは0.3~2MPaが用いられる。

【0052】

また、成形直前に高周波誘導加熱で金型表面を加熱して成形する射出成形方法（特公昭62-58287号公報、米国特許第4439492号等に記載）や成形直前に輻射加熱で金型表面を加熱して成形する射出成形方法（成形加工シンポジア'95, 241<1995>、成形加工'96, 69<1996>、合成樹脂, 42巻（1）, 48<1992>等に記載）などの、金型表面を加熱して成形する射出成形方法も、本発明におけるマイクロチップの製造に好ましい成形方法である。つまり、前記成形方法は、金型温度を低く設定し、高周波誘導加熱やハロゲンランプ等の熱源により成形直前に金型表面だけを選択的に加熱して、型表面転写性と成形サイクルの両立をはかれる成形方法であるからである。

【0053】

このようなマイクロチップ成形用の金型は、鉄または鉄を主成分とする鋼材、アルミニウム、またはアルミニウムを主成分とする合金、亜鉛合金、ベリリウム-銅合金等の一般に合成樹脂の成形に使用されている金属金型が良好に使用できる。

金型作製方法の1つの例をあげる。まず、金属、プラスチック、シリコンまたはガラス等の材料から、切削加工やエッチング加工、または紫外線硬化樹脂のフォトリソグラフィ加工等の方法により、目的とする微細な溝を有する有機ポリマー製の平板状部材の表面形状を有する母型を1つ作成する。そして、この母型からニッケル等の電気化学的鑄造法により、金型が作製される。

【0054】

また、特開平6-283830号公報のレジストパターンを形成する方法を用いて金型を作ることも可能である。金属基板にレジストパターンを形成した後、レジストの無い部分を金属メッキで埋める。そして、レジストを除去して、基板表面に微細なパターンを施した金属板を形成する。この金属板を金型にして、樹脂や焼結ガラスなどの加工を行うことが可能である。

【0055】

本発明において使用される有機ポリマー製のマイクロチップを、前述の特開平

6-283830号公報の回路基板を製造する方法に基づいて製造することも可能である。

また、ガラス基板を使用してマイクロチップを製造する場合、ガラス基板上にレジストパターンを形成して、サンド・ブラスト法でガラス基板を加工する方法があげられる。この方法によれば、飛来する粒子の方向が厚いレジストにより垂直方向に揃うため、通常の薄いレジストに比べてシャープな加工が可能で、高アスペクト比の溝を作ることができる。さらに、ガラスや樹脂基板上に感光性レジストを塗布し溝以外の部分を露光した後、未硬化部分を除去して、溝の形状のレジストパターンを基板上に形成する手法も採用可能である。さらにまた、レーザー等で両面を貫通する溝を設けたガラス平板を、別の2枚のガラス平板で挟むことによっても、本発明において使用されるマイクロチップを製造することが可能である。

【0056】

また、溝を有する平板状部材からなる前記マイクロチップは、溝の内面をポリエチレングリコールなどで蛋白吸着防止処理をしてもよい。また、後述する電気浸透流を送液手段として使う場合は、安定した電気浸透流を発生させるための表面処理を行っても良い。

本発明におけるマイクロチップとしては、2枚の平板状部材から構成されるものが好ましい。その少なくとも一方は上記のような溝を有していて、該溝を有する面を内側にして他方の平板状部材と張り合わせる。そして、超音波融着、熱融着、ホットメルト接着剤やUV接着剤等の接着剤による接着、粘着剤による粘着、直接または薄い弾性シートを介しての圧接等の方法で一体化して作られる。

【0057】

溝を有していない平板状部材（以降は、被せ平板と記す）の材料は、上記溝を有する平板状部材に用いられる材料の中から選ぶことができる。また、薄いガラス板なども用いることができる。2つの平板状部材の材料は、同じ材料でもよいし、異なる材料であってもよい。厚みは、検出の障害になることが無ければ、特に限定されるものではないが、0.05～数mm程度が好ましい。どのような材料を用いる場合でも、熱レンズ検出法による検出部においては、励起光及びプロ

ーブ光の吸収率が、前述のように5%以下、より好ましくは1%以下であることが重要である。

【0058】

また、本発明におけるマイクロチップの構成は、加工生産性の点からは、上記のように2枚の平板状部材からなり、その少なくとも一方は溝を有していて、該溝を有する面を内側にして他方の平板状部材と張り合わせた構造をとることが好ましいが、貫通溝をもつ平板状部材を、他の平板状部材2枚で挟んで溝を形成させた3枚構成とすることも可能である。

【0059】

前記被せ平板には、リザーバー用の貫通孔があいていてもよいし、被せ平板から突起する形で円筒形のリザーバー（廃液溜を含む）が装着されていてもよい。このリザーバーの大きさは特に限定されるものではないが、高さ1～数mm、径1～数mm程度が好ましい。溝を有する平板状部材や被せ平板が、数mm程度の厚みを有する場合、該貫通孔が液だめを兼ねることもできる。

【0060】

本発明で言う流量とは、溝（キャピラリ）中を一定時間内に移動する液体の体積を意味する。

また、前記平板状部材の表面に有する液体の流れる溝の断面形状は、四角形であることが好ましいが、三角形等の他の多角形の形状、半円形、半楕円形等、他の形状でもよい。また、マイクロチップが何種類かの異なった形状の溝を組み合わせる流路を有していてもよい。ただし、熱レンズ検出法による検出部に関しては、溝の断面形状は長方形であることが好ましい。なお、溝の上面（開放面）の幅は、溝の下面（底）の幅と同じであるか、または広くてもよい。

【0061】

また、この溝は、あまり小さすぎると、微粒子が混入した場合や血球などによる目詰まりの原因となる。また、あまり大きすぎると、二液の合流時に拡散による混合の効率が低下する。そのため、血液試料の通過部分は、幅が20～500 μm 、深さが20～1000 μm であることが必要である。好ましくは、幅が50～300 μm 、深さが30～200 μm である。血球溶血後の流路は、幅が1

～500 μm 、深さが0.1～1000 μm 、断面積が1～250000 μm^2 であることが好ましい。更に好ましくは、幅が2～300 μm 、深さが1～200 μm 、断面積が2～60000 μm^2 である。

【0062】

前記平板状部材の溝の寸法精度は、極微料成分の分析や定量分析等を行う上では、優れていることが好ましい。すなわち、溝の寸法精度（寸法転写精度）は、操作の精度および個々の分析装置間の再現性を得るため、設計寸法に対し、幅および深さが±5%以内、断面積が±7%以内であることが好ましい。また、高精度の定量分析を行うためには、幅および深さが±2%以内、断面積が±4%以内の寸法精度を有することが更に好ましい。

（送液方法について）

本発明においては、マイクロチップ内での定量反応を、チップ内又は外で、計量槽によって血液試料と測定試薬とを各々一定量秤取して混合することにより行うことができる。あるいは、測定試薬に対する血液試料の流量比を制御することによって、測定試薬と血液試料とを一定比率で混合し、少なくとも一定時間以上連続的に反応する方法で行うこともできる（前述の特願平10-181586号明細書（本出願人による「混合分析装置および混合分析方法」））。

【0063】

送液方法としては、チップ外のポンプや遠心力を送液手段として用いることができる。

また、溝（キャピラリ）中の液体に電界を印加して、電気泳動や、電気浸透流によって送液を行うこともできる（「キャピラリ電気泳動」講談社 等に詳しく記載されている）。電気浸透流は、キャピラリ内面の表面のイオンの移動によってキャピラリ内の液体が一緒に移動するものである。キャピラリがガラスやシリコンで形成される場合は、ガラス表面のケイ酸のプロトンなどが移動力となる。

また、PMMAやPCなどの有機ポリマー等からなるマイクロチップで、キャピラリ内面に特別のイオン種が存在しない場合でも、キャピラリ内を流す液体の組成によっては、その液体中の電解質をキャピラリ内面に吸着させ、その電解質の移動により電気浸透流を生じさせることができる。安定した電気浸透流を発生さ

せるため、キャピラリ内面の表面に、スルホン酸基やカルボン酸基を有する有機ポリマーをグラフト重合などで付加しても良い。また、水酸化ナトリウム水溶液等で、PMMAなどの表面を加水分解して、キャピラリ内面の表面にカルボン酸基を形成することも有効である。

【0064】

電気浸透流では、電圧の制御により、細かく即応的に、また、設定したプログラムに従って正確な流量を制御できるので、マイクロチップ内での反応や分離を、精度良く制御できるので好ましい。

電気浸透流を発生させる電源としては、高電圧電源装置（例えばModel HCZE-30PN0,25、松定プレジジョン、30kVまで印加可能）を用いるが、これはインターフェイスボード（例えばDAQCard-1200、CB-50コネクタブロック、ナショナルインスツルメント）を介して外部のコンピューターから出力制御できる。電圧の印加タイミング等のプログラムは、例えばNI-DAQドライブソフトウェア、LabVIEW）などで作製できる。

（マイクロチップのキャピラリ（流路）形態について）

測定試薬や血液試料の混合や希釈を主な目的としたマイクロチップの流路（キャピラリ）の形状には、1本の流路に他の流路を合流させた形状や、1本の流路に複数本の流路を一カ所で合流させた形状を採用することができる。1本の流路に他の流路または複数の流路を合流させ一本の流路とすることにより、混合操作や希釈操作を行うことができる。また、この時、各々の流量を変えることにより、異なった比率での混合や希釈も可能である。

【0065】

混合や希釈の比率は、送液方法がポンプによる場合には、合流する各流路の流量を機械的に変えることができるし、また、電気浸透流による場合には、合流する各流路の断面サイズや長さを変えたり、各流路への電圧のかけ方を変えたり、各流路キャピラリ内表面の荷電状態を表面処理等により変えることによっても、合流する各流路の流量を調節することができる。

【0066】

また、遠心力による送液では、中心からの距離、回転数なども考慮して流路設

計をする必要がある。

血液試料と測定試薬とを反応させた後、分離のために一定量を秤取することなく、混合から反応、検出まで一貫した流路で連続的に処理が可能である。

このような、流量比で混合比率を規定し反応させる方法は、長時間連続的に行う必要はなく、例えば、混合に10秒かかるとしたら、最低10秒間（通常はやや多めに20秒程度）、血液試料と測定試薬との合流を行い、この血液試料と測定試薬との混合物を、反応に十分な時間だけ流路内を移動させ、その後他の測定試薬との合流を同じく最低10秒間行えばよい。そして、それから必要時間反応後、流路中を流してから検出を行う。

【0067】

また、マイクロチップ中に計量槽（メスシリンダー）を設けて、この計量槽にて血液試料や測定試薬を計り取り、それを混合して熱レンズ検出装置に供することもできる。

本発明においては、血液試料と測定試薬との反応は、30秒程度でほぼ完結する。ただし、混合のための時間や、より完全な反応のために、2～10分の時間を取ることが好ましい。

（実験例1：血液試料と測定試薬との混合比および酸化剤濃度についての検討）

熱レンズ検出法の必要条件として、波長633nmの励起光の吸光度に対する測定試薬の混合比の影響を検討した。測定試薬（溶血酸化試薬液）としては、フェリシアン化カリウム（ $K_3Fe(CN)_6$ ）、MES（2-（N-モルフォリノ）エタンスルホン酸）、トリトンX-100を、それぞれ0.61mM、10mM、0.8重量%の濃度で溶解させた溶液（pH6.0）を用いた。

【0068】

血液試料は健常人からヘパリン採血したものをを用いた。血液試料と測定試薬との混合比が1：250の場合では、血液試料4 μ lに対し上記測定試薬を996 μ l、混合比1：415では、PBS（磷酸緩衝液）で60%に希釈した血液試料4 μ lに対し上記測定試薬を996 μ l、混合比1：1245では、PBSで20%に希釈した血液試料4 μ lに対し上記測定試薬を996 μ l添加した。

【0069】

添加直後からの経時的な吸光度変化を、図1（混合比1：250）、図2（混合比1：415）、図3（混合比1：1245）に示す。添加直後に比べて、1200秒（20分）後の吸光度の低下は、混合比1：250で8.5%、混合比1：415で16.3%、混合比1：1245で31%であった。

混合比を1：4にした場合は、上記測定試薬800 μ lと血液試料200 μ lを混合して室温下で5分放置しても、図4に示すように、メトヘモグロビンへの酸化が不十分だった。

【0070】

そこで、測定試薬中の酸化剤の濃度を上げて、フェリシアン化カリウム、MES、トリトンX-100の濃度を、それぞれ10mM、12.5mM、1重量%とした（pH6.0）。

血液試料200 μ lとこの酸化剤の濃度を上げた測定試薬800 μ lとを混合し、5分後の吸光度を測定した。その結果、図5に示すように、ヘモグロビンの酸化が進んでいた。この条件での、混合後30秒後、10分後、20分後の吸収スペクトルを図6に示す。この場合の混合直後に比べた1200秒（20分）後の吸光度の低下は、2.9%と安定であった。

（実験例2：pH値の影響についての検討）

フェリシアン化カリウム、トリトンX-100を、それぞれ0.61mM、0.8重量%の濃度で溶解させた溶液を測定試薬として用いて、pH値の検討を行った。pH値は、以下に示すpH値調整用の試薬を用いて調整した。pH2およびpH4は、10mMクエン酸バッファーをNaOHで調整したもの、pH6は10mMのMESバッファー、pH8は10mMのTRIZMA（シグマ社製）バッファー、pH10は約1mMのNaOH溶液、pH12は約10mMのNaOH溶液を用いて、それぞれ調整した。

【0071】

633nmの吸光度を図7に示した。メトヘモグロビンの吸収（630nm）は、pH2, 6, 10ではピークを示すが、pH4, 8, 12ではショルダーとなり、ピークを示さなかった。700nmのバックグラウンド吸光度は、pH2で0.34, pH4で0.05, pH6で0.02, pH8で0.00, pH1

0で0.00, pH12で0.00であった。

【0072】

かくして、本発明のヘモグロビン測定方法によれば、微量の血液試料からヘモグロビンの濃度測定が可能である。また、励起光として長波長レーザーを用いるため、熱レンズ検出装置が安価に製造でき、経済的である。したがって、本発明のヘモグロビン測定方法は、POC分析に好適な測定方法である。

さらに、本発明のヘモグロビン測定方法は、毒物であるシアン化カリウム等のシアニドを測定試薬中に含有しないため、煩雑な廃液処理が不要である。

【0073】

【発明の実施の形態】

(実施例1)

He-Neレーザーを励起光として用いた熱レンズ検出法により、ヘモグロビン測定における血液試料の希釈直線性について検討を行った。以下に、その内容を説明する。

【0074】

光熱変換検出装置の構成は、以下の通りである。顕微鏡にはステージ上での測定試料の取り扱いの容易さを勘案し、倒立型顕微鏡 (IX70、Olympus製) を使用した。これは別に落射型の顕微鏡であっても構わない。この顕微鏡は、顕微鏡外の光学系で同軸にされたレーザー光を導入できるように改造を加えてある。レーザーは、励起用にはHe-Neレーザー (633nm、10mW、エドモントサイエンティフィック製) を、検出用のプローブ光には半導体レーザー780nm (日本科学エンジニアリング社LDT7830) を使用した。ミラー、ビームエクspander等の光学系はメスグリオ社製品で統一した。

【0075】

励起用のレーザー光はライトチョッパーにより変調された後、ダイクロイックミラーにより検出用レーザーと同軸にされ、顕微鏡に導かれ測定試料に照射される。測定試料を照射した後、同軸にされたレーザー光の内、励起光のみを選択的にフィルターにより除去しフォトセンサーに導く。レーザー光受光部分の素子には、取り扱いの簡便性を考えファイバー付きのフォトセンサーアンプ (C638

6、浜松ホトニクス社製)を使用した。このフォトセンサー受光部はピンホールを持つカバーで覆われている。フォトセンサーおよびセンサーアンプからの出力は低雑音プリアンプ (LI-75A、エヌエフ回路ブロック社製) で増幅した後、ロックインアンプに導かれ信号処理が行われる。

【0076】

このような熱レンズ検出装置を用いて、血液試料の希釈によるヘモグロビン定量の直線性を、以下のように検討した。

ヘパリンを加えた健常人血液 (ヘモグロビン濃度は 16 g/dl) を血液試料として用いた。測定試薬には、フェリシアン化カリウム、MES、トリトンX-100を、それぞれ 8 mM 、 10 mM 、 0.8 重量%の濃度で溶解させた溶液 ($\text{pH} 6.0$) を用いた。測定試料中のヘモグロビン (Hb) 濃度が $6400 \mu\text{g/ml}$ の場合は、血液試料 $40 \mu\text{l}$ に前記測定試薬を $960 \mu\text{l}$ 加え (混合比は $1:24$) 混合し、室温で5分以上静置した後に、熱レンズ検出法で測定した。測定試料中のHb濃度が $640 \mu\text{g/ml}$ の場合は、血液試料 $4 \mu\text{l}$ に測定試薬 $996 \mu\text{l}$ を加え混合し、測定試料中のHb濃度が $384 \mu\text{g/ml}$ の場合は、PBSで60%に希釈した血液試料 $4 \mu\text{l}$ に測定試薬 $996 \mu\text{l}$ を加え混合し、測定試料中のHb濃度が $128 \mu\text{g/ml}$ の場合は、PBSで20%に希釈した血液試料 $4 \mu\text{l}$ に測定試薬 $996 \mu\text{l}$ を加え混合した。

【0077】

こうして得られた各測定試料を、 $50 \mu\text{m}$ の深さをもつ平板ガラス製キュベット (GL Sciences社製 Quartz Cell Type AB20-SQ-0.05) に移し、このキュベットを倒立顕微鏡のステージ上に置いた。対物レンズの焦点合わせは励起用レーザーを使用し、モニター画面を参照しつつ、溝パターンの上辺、下辺の位置での焦点合わせを実施した後、その中間点を溝の中心位置として行った。

【0078】

励起用レーザーは、ライトチョッパーにより 3289 Hz に変調され、メトヘモグロビンを励起し発熱を生じさせた。このライトチョッパーによる変調の周波数は、SN比等の影響により変更することも有り得る。この発熱により発生した熱レ

ンズにより検出用レーザーの焦点位置がずれ、それによりピンホールを通してフォトセンサーの受光量が発熱量に応じ変化する。フォトセンサーからの信号はロックインアンプにより処理されるが、ここでは時定数として1秒を用い、ライトチョッパーと同じ周波数3289 Hzの信号のみを選択的に出力として用いた。

【0079】

この結果を図8に示す。縦軸は熱レンズ検出法による出力強度 (mV)、横軸上段は、血液試料中のヘモグロビン濃度、横軸下段は、測定試薬と混合後の測定試料中のヘモグロビン濃度である。

(実施例2)

有機ポリマー製マイクロチップを用い、励起光として635 nmの半導体レーザーを用いて、血液試料中のヘモグロビンの測定を行った。以下にその内容を説明する。

【0080】

マイクロチップを構成する、表面に溝を有する平板状部材は、射出成形により成形した。射出成形に使用した樹脂は、メタクリル樹脂（旭化成工業製デルベツト 80NH）である。ガスとしては純度99%以上の二酸化炭素を使用し、その圧力は1 MPaとした。成形機は住友重機械工業製SG50を使用した。成形品は、厚み2 mmで、縦横が120 mm、60 mmの平板状部材である。

【0081】

この平板状部材の表面の、幅100 μ m、深さ50 μ m、長さ3 cmの直線状の溝の両端には、測定試料導出入用の貫通孔を設けるための円形溝（直径3 mm、深さ50 μ m）が形成されている。その円形溝部分に、ドリルで直径2 mmの貫通孔をあけて、測定試料導出入部とした。

なお、金型の母型は、シリコンをRIEの手法でエッチングしたものと、DFR（ドライフィルムレジスト）で光硬化させたものの両方を比較したが、母型を電鍍してスタンパーを作成後、平板状部材を射出成形したところ、どちらの母型もほぼ同じ成形品が得られた。

【0082】

また、金型の表面状態の転写性は、光学顕微鏡による観察およびレーザー顕微

鏡による形状測定で評価する。また、成形品も、光学顕微鏡による観察、切断断面の溝形状の光学顕微鏡や電子顕微鏡での観察、レーザー顕微鏡による形状測定等で観察する。

こうして得られた平板状部材の溝を有する面に、 $200\mu\text{m}$ 厚みのメタクリル樹脂シートに光硬化型接着剤を塗布したものを張り合わせ、UV光を照射して、両端のみが開放されたキャピラリを形成させ、これを測定用のマイクロチップとした。

【0083】

光熱変換検出装置としては、基本的には実施例1記載の装置を用いたが、励起光用レーザーを、 633nm のHe-Neガスレーザーから 635nm の発光をもつ半導体レーザー三洋電機社製DL-4038-025に変え、光学系を調整した。

測定試料としては、ヘパリンを加えた健常人血液（ヘモグロビン濃度は 16g/dl ）を、測定試薬（フェリシアン化カリウム、MES、トリトンX-100を、それぞれ 8mM 、 10mM 、 0.8 重量%の濃度で溶解させた溶液（ $\text{pH}6.0$ ））と混合反応させたものを用いた。すなわち、測定試料中のヘモグロビン濃度が $6400\mu\text{g/ml}$ の場合は、前記血液試料 $40\mu\text{l}$ に前記測定試薬を $960\mu\text{l}$ 加え混合し、測定試料中のヘモグロビン濃度が $640\mu\text{g/ml}$ の場合は、血液試料 $4\mu\text{l}$ にPSB $36\mu\text{l}$ を加えたものに測定試薬液 $996\mu\text{l}$ を加え混合し、それぞれ室温で5分以上静置したものを用いた。

【0084】

これらの測定試料 $2\mu\text{l}$ （これに含まれている検体血液量は 40n l 及び 4n l ）を、前述のように作成したマイクロチップの貫通孔からキャピラリに導入し、熱レンズ検出法による出力を検出した。その結果、ヘモグロビン濃度 $640\mu\text{g/ml}$ では 0.5mV 、 $6400\mu\text{g/ml}$ では 5mV 程度の出力が検出された。

（実施例3）

次に、血液試料と測定試薬とを混合、反応させる測定試料の調製と、熱レンズ検出法による測定試料のヘモグロビン測定とを、有機ポリマー製マイクロチップ

中で行った例について、その内容を説明する。

【0085】

光熱変換検出装置は、実施例2と同様のものを用いた。

また、マイクロチップについても、実施例2と同様の方法で作成した。まず、図9のような表面に溝を有するPMMA製の平板状部材31を、射出成形により成形した。該平板状部材31の外形寸法は実施例2と同じである。そして、この平板状部材31の円形溝1, 2の部分に、ドリルで直径1mmの貫通孔をあけて、血液試料及び測定試薬の導入部とした。また、同様に、円形溝3の部分に貫通孔をあけて、廃液の導出部とした。

【0086】

こうして得られた貫通孔を有する平板状部材31の溝を有する面に、厚み200 μ mのメタクリル樹脂シートに光硬化型接着剤を塗布したものを張り合わせ、UV光を照射して、溝の端部のみが開放されたキャピラリを形成させ、これを測定用のマイクロチップとした。

図9は、形成されたキャピラリの流路形状を示すものである。流路の端部には、血液試料用リザーバー1、測定試薬用リザーバー2、及び廃液溜め3が設けられており、両リザーバー1, 2及び廃液溜め3の貫通孔部分を除く大きさは、直径3mm、深さ50 μ mである。

【0087】

キャピラリ（流路）はすべて、深さ50 μ m、幅150 μ mであり、長さは、流路11が9mm、流路12が9mm、流路13が65mmである。流路13には、光熱変換検出法（熱レンズ検出法）による検出部21が設けてあり、流路11と流路12との合流点22から検出部21までの距離は60mmである。

測定試薬としては、フェリシアン化カリウム、MES、トリトンX-100を、それぞれ8mM、10mM、0.8重量%の濃度で溶解させた溶液（pH6.

0）を用いた。血液試料としては、ヘパリンを加えた健常人血液（ヘモグロビン濃度は16g/dl）、及びそれをPSBで希釈してヘモグロビン濃度を10g/dlに調整したものを用いた。

【0088】

25 μ l のマイクロシリンジ（ハミルトン社製）に血液試料を4 μ l 取り、該マイクロシリンジをテフロンチューブにより、血液試料用リザーバー1の貫通孔に連結した。また、別のマイクロシリンジに測定試薬を20 μ l 取り、該マイクロシリンジを別のテフロンチューブにより、測定試薬用リザーバー2の貫通孔に連結した。

【0089】

両マイクロシリンジを2台のマイクロシリンジポンプ（ハーバード社製）に別々に装着し、血液試料の流速が0.2 μ l/h r、測定試薬の流速が4.8 μ l/h r になるように、各マイクロシリンジポンプを設定した。これで、血液試料と測定試薬との混合比は1:24となる。混合後の反応時間は、図9の流路13を流れる時間であるので、5.4分程度となる。

【0090】

室温下で前記両マイクロシリンジポンプを動かし、熱レンズ検出法による出力を測定した結果、ヘモグロビン濃度16 g/d l の血液試料で4.0 mV 程度の出力が得られ、ヘモグロビン濃度10 g/d l に調整した希釈血液試料では、2.5 mV 程度の出力が得られた。

（参考例）

プローブ光の光源として、488 nm に発光を持つ Ar レーザーを用いた以外は、実施例1と同様にして、ヘモグロビンの測定を行った。

【0091】

血液試料としては、ヘパリンを加えた健常人2名の血液（ヘモグロビン濃度は16 g/d l）を、検体1および検体2として用いた。これらの血液試料をPBSで60%、20%になるように希釈し、0.6×検体、0.2×検体とした。この希釈検体または希釈しない血液試料（1×検体）4 μ l に、測定試薬（フェリシアン化カリウム、MES、トリトンX-100を、それぞれ0.61 mM、

10 mM、0.8重量%の濃度で溶解させた溶液（pH 6.0）を996 μ l 加え混合し、室温で5分以上静置した後に測定を行った。

【0092】

結果は、バックグラウンドを差し引いた後の、熱レンズ検出法による出力で示

すと、表1のようになった。

【0093】

【表1】

	検体1	検体2
20%希釈	200～300mV	3mVから10分後には 250mVまで増加
60%希釈	2～6mV	3～6mV 漸増
希釈なし	6mV 不安定	3.1mVで安定

【0094】

この表から明らかなように、全体に熱レンズ検出法による出力が安定せず、特に希釈検体で異常な高値を示した。これらの現象は、各実施例では見られなかったものである。633nmの励起光と、488nmのプローブ光が同時に照射されることにより、ヘモグロビンの種々の励起状態が惹起され、エキサイプレックスのような光反応が生じるか、あるいは、血液中の他の成分が488nmの光を吸収して、ヘモグロビンと相互作用することが原因の一つとして考えられるが、詳細は明かではない。

【0095】

【発明の効果】

以上のように、本発明のヘモグロビン測定方法によれば、光熱変換検出法を用いることにより、極微量の血液試料中のヘモグロビンを簡便かつ短時間に測定することができる。

特に、請求項3および請求項4記載のヘモグロビン測定方法によれば、励起光として長波長レーザーを用いたため、熱レンズ検出装置を安価に製造できるので

、ヘモグロビンの測定を低コストで行うことができる。

【0096】

また、請求項5記載のヘモグロビン測定方法は、試料調製工程と光熱変換検出工程をマイクロチップ内において行うので、測定に要する血液試料および測定試薬が微量で、かつ血液試料と測定試薬とを混合して測定試料を調製する操作が、簡便である。

さらに、請求項7記載のヘモグロビン測定方法は、測定試薬に毒物であるシアニドを含有しないので、測定試薬の取扱いに危険を伴うことがなく、また、煩雑な廃液処理も不要である。

【0097】

さらにまた、請求項8記載のヘモグロビン測定方法によれば、血液試料中のヘモグロビンの安定な測定が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1：1245の場合の、635nm（上の曲線）と780nm（下の曲線）とにおける測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

【図2】

実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1：415の場合の、635nm（上の曲線）と780nm（下の曲線）とにおける測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

【図3】

実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1：250の場合の、635nm（上の曲線）と780nm（下の曲線）とにおける測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

【図4】

実験例1において、血液試料と測定試薬とを1：4で混合し、5分間反応させた後の測定試料の吸収スペクトルである（測定試薬中の酸化剤濃度は、図1～3の場合と同じ）。

【図 5】

実験例 1 において、血液試料と測定試薬とを 1 : 4 で混合し、5 分間反応させた後の測定試料の吸収スペクトルである（測定試薬中の酸化剤濃度を、図 4 の場合より上げた場合）。

【図 6】

実験例 1 において、血液試料と測定試薬とを 1 : 4 で混合した後の、測定試料の吸収スペクトルの経時変化である（測定試薬中の酸化剤濃度は、図 5 の場合と同じ）。（a）は混合後 30 秒後、（b）は 10 分後、（c）は 20 分後を示す。

【図 7】

実験例 2 において、pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 の各条件下での測定試料の吸収スペクトルである。

【図 8】

（a）は、実験例 3 において、ヘモグロビン濃度と熱レンズ検出法による出力の関係を示すグラフである。（b）は、（a）の横軸のヘモグロビン濃度の低濃度の部分を拡大したグラフである。

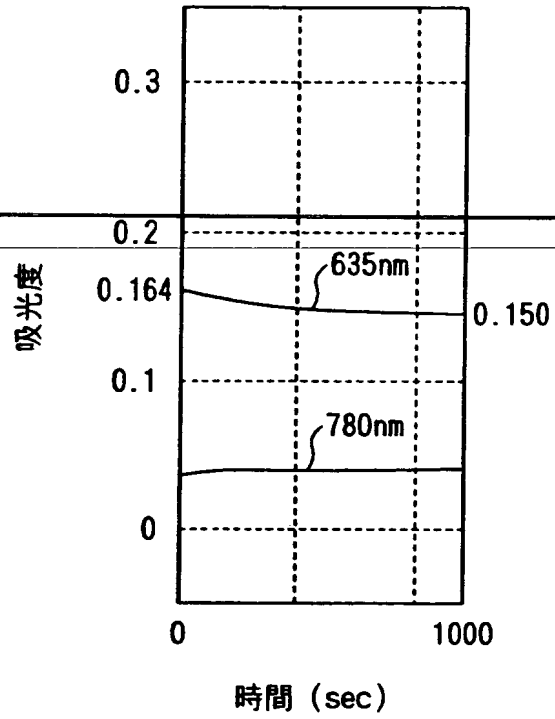
【図 9】

有機ポリマー製マイクロチップの流路形状を示す図である。

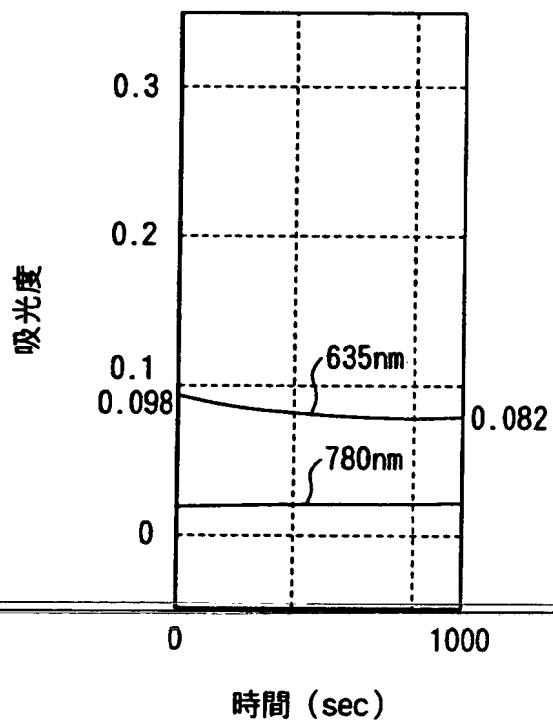
【書類名】

図面

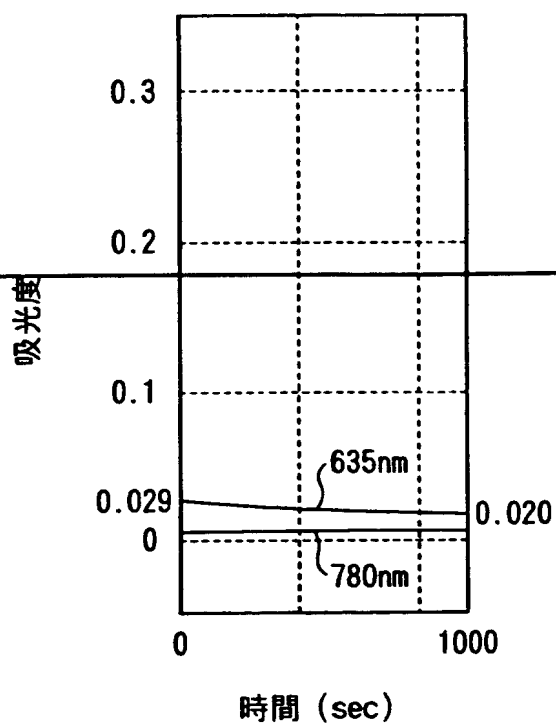
【図 1】



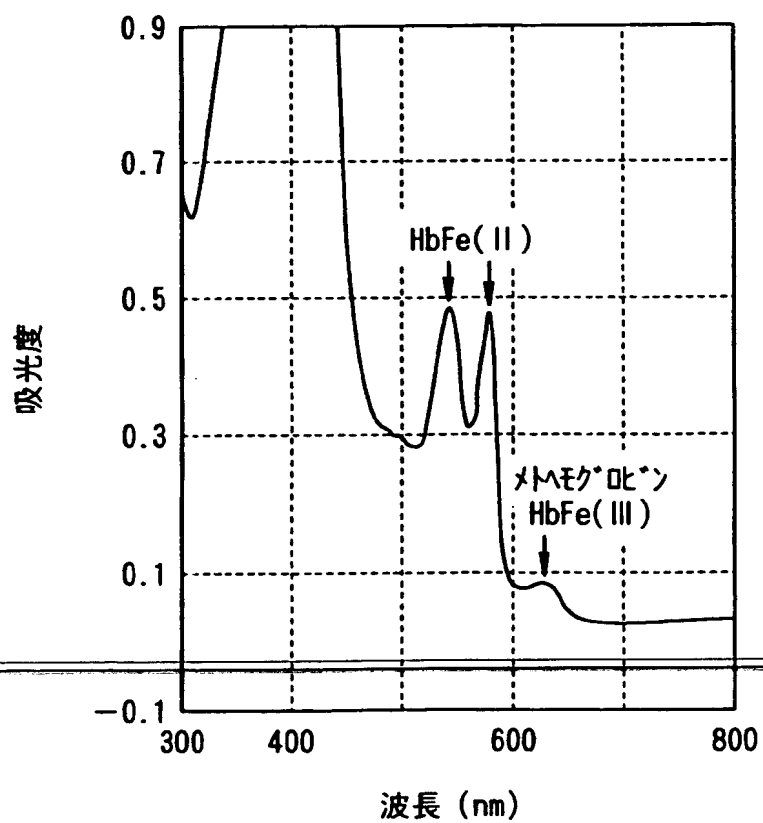
【図 2】



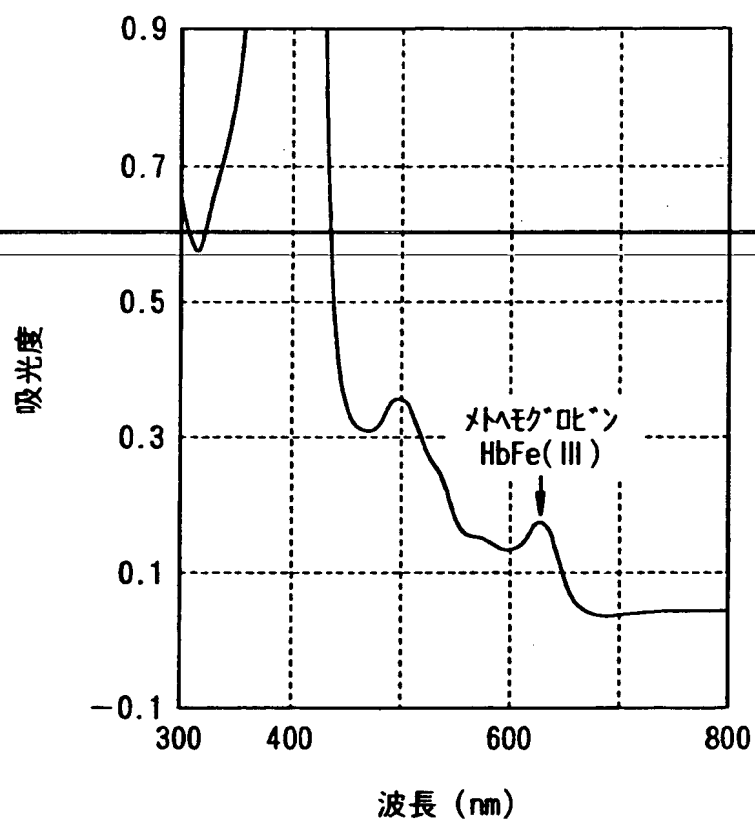
【図 3】



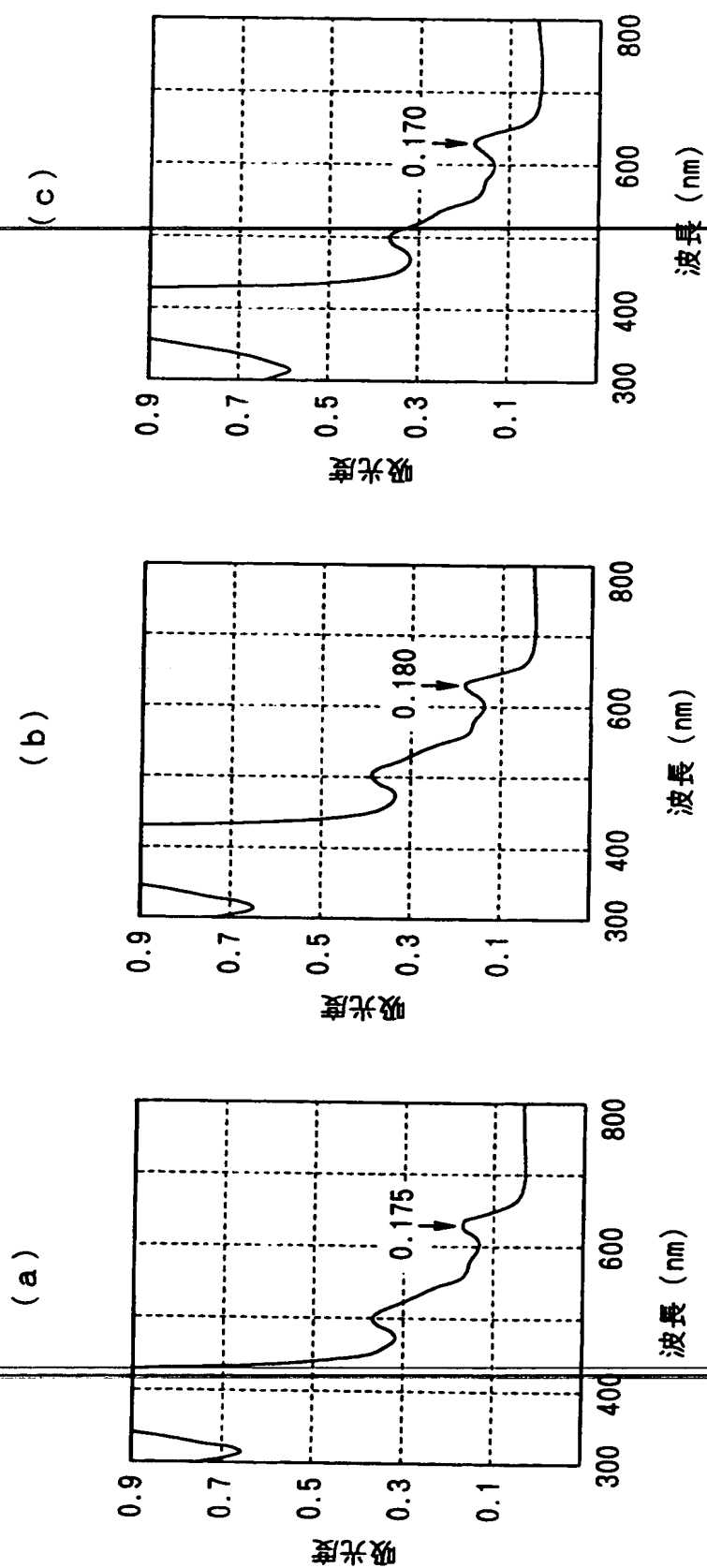
【図 4】



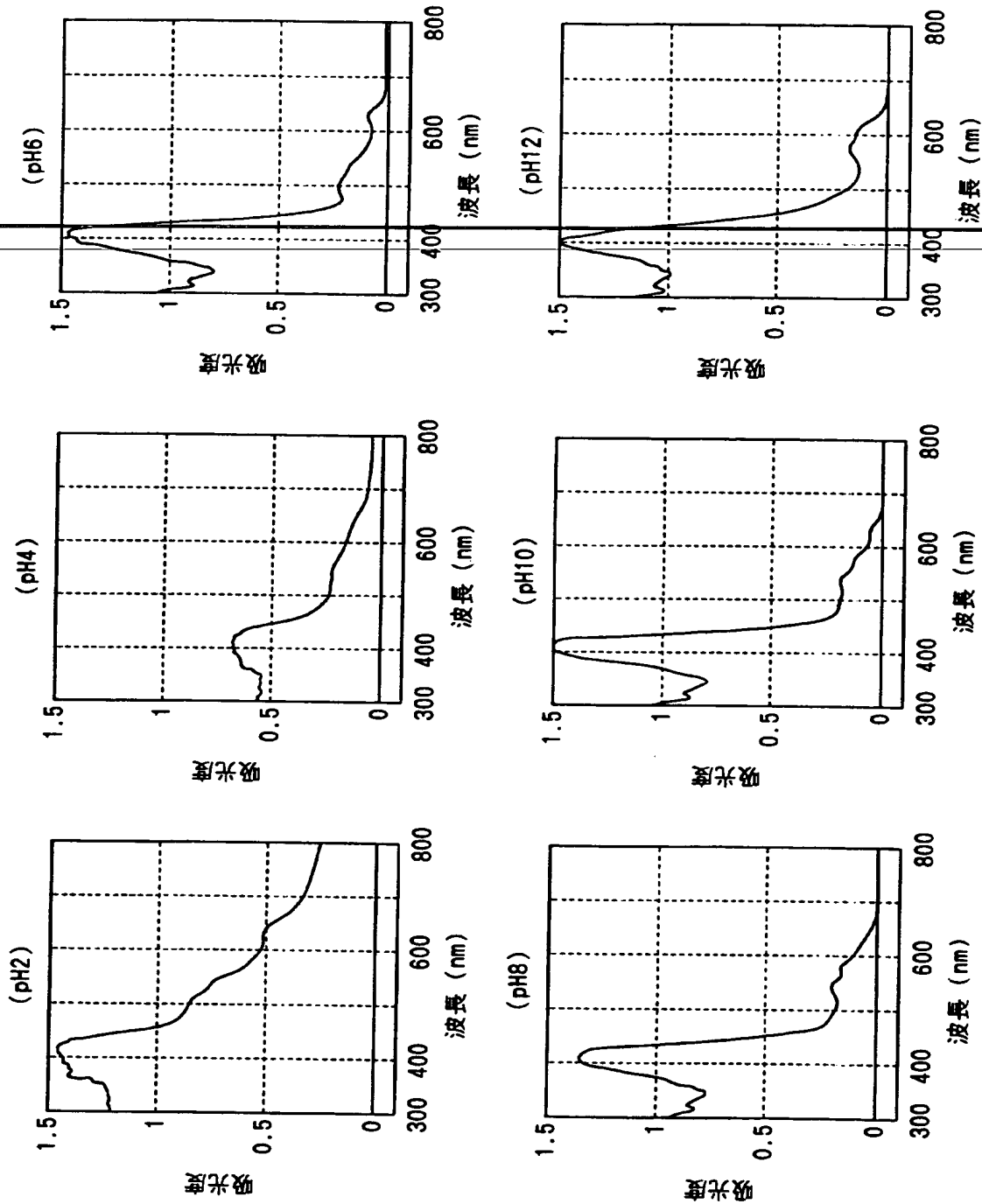
【図 5】



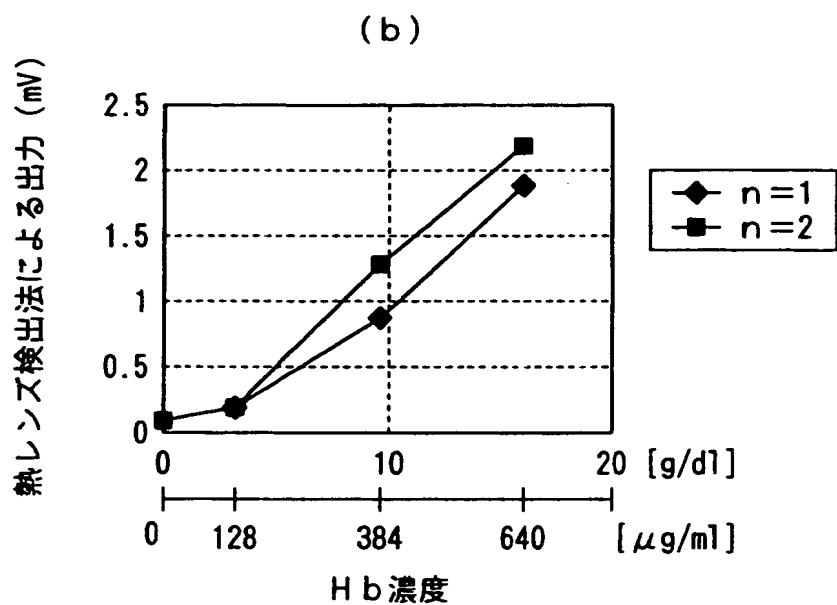
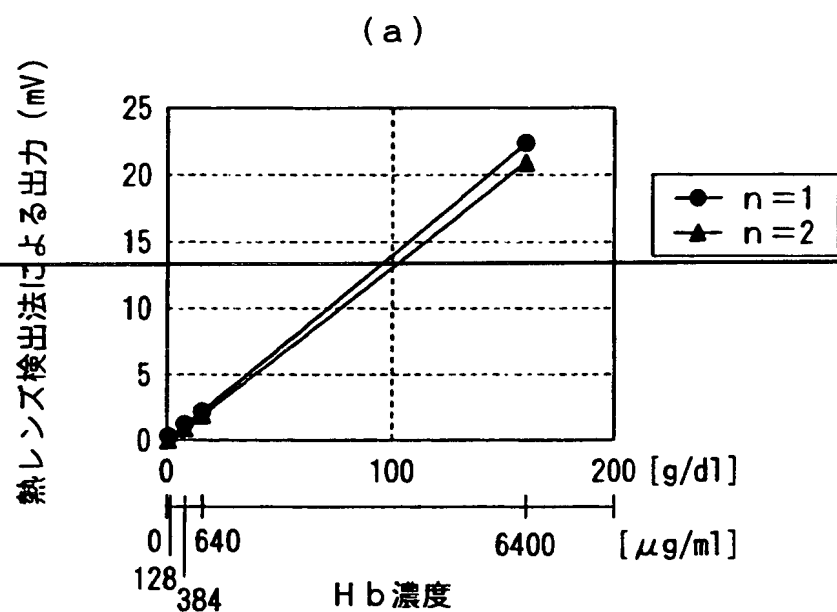
【图 6】



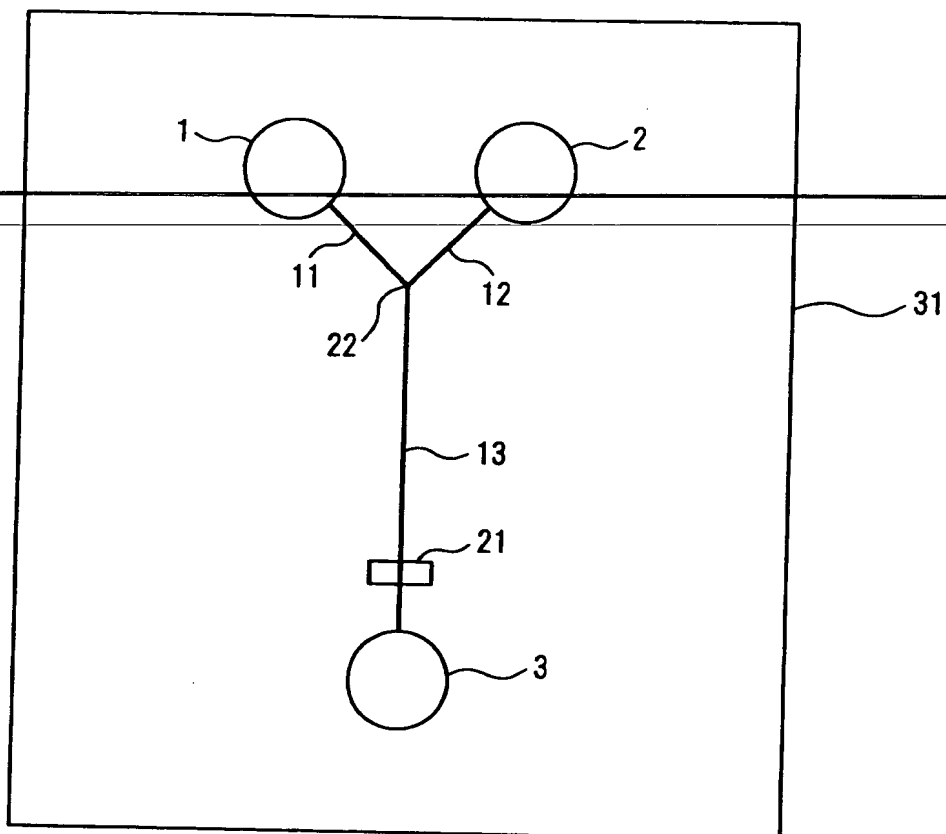
【图 7】



【図 8】



【图9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 POC分析に適用するのに好適であって、安価なレーザー装置を用いて、シアニドを含む測定試薬を使用することなく、微量の血液試料中のヘモグロビンを測定する方法を提供する。

【解決手段】 血液試料中のヘモグロビンの検出またはその濃度の測定を行う方法を、血液試料と測定試薬とを混合し溶血させて測定試料を調製する試料調製工程と、測定試料に波長635nmの励起光を照射して、その結果生じる部分的な温度変化に伴う屈折率変化により形成される熱レンズに、波長780nmのプロープ光を入射し、該熱レンズにより生じる該プロープ光の変化を測定する光熱変換検出工程と、を備える構成とした。また、試料調製工程および光熱変換検出工程は、マイクロチップのキャピラリ内で行い、さらに、測定試薬はシアニドを含有しない構成とし、血液試料と測定試薬との混合比は、1:24および1:249とした。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 B99037
【提出日】 平成11年 9月 6日
【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿
【事件の表示】
【出願番号】 平成11年特許願第203406号

【補正をする者】

【識別番号】 000000033
【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社
【代理人】
【識別番号】 100066980
【弁理士】
【氏名又は名称】 森 哲也
【ブルーフの要否】 要

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 0097
【補正方法】 変更
【補正の内容】 1

【0097】

さらにまた、請求項8記載のヘモグロビン測定方法によれば、血液試料中のヘモグロビンの安定な測定が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1：250の場合の、635nm（上の曲線）と780nm（下の曲線）における測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

【図2】

実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1：415の場合の、635nm（上の曲線）と780nm（下の曲線）における測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

【図3】

実験例1において、血液試料と測定試薬との混合比が1：1245の場合の、635nm（上の曲線）と780nm（下の曲線）における測定試料の吸光度の経時変化を示すグラフである。

【図4】

実験例1において、血液試料と測定試薬とを1：4で混合し、5分間反応させた後の測定試料の吸収スペクトルである（測定試薬中の酸化剤濃度は、図1～3の場合と同じ）。

【図5】

実験例1において、血液試料と測定試薬とを1：4で混合し、5分間反応させた後の測定試料の吸収スペクトルである（測定試薬中の酸化剤濃度を、図4の場合より上げた場合）。

【図6】

実験例1において、血液試料と測定試薬とを1：4で混合した後の、測定試料の吸収スペクトルの経時変化である（測定試薬中の酸化剤濃度は、図5の場合と同じ）。（a）は混合後30秒後、（b）は10分後、（c）は20分後を示す。

【図 7】

実験例 2 において、 pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 の各条件下での測定試料の吸収スペクトルである。

【図 8】

(a) は、実験例 3 において、ヘモグロビン濃度と熱レンズ検出法による出力の関係を示すグラフである。(b) は、(a) の横軸のヘモグロビン濃度の低濃度の部分を拡大したグラフである。なお、横軸上段の g/dl 単位の数字は、血液試料中のヘモグロビン濃度を示し、横軸下段の $\mu\text{g/ml}$ 単位の数字は、測定試料中のヘモグロビン濃度を示す。

【図 9】

有機ポリマー製マイクロチップの流路形状を示す図である。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第203406号
受付番号	59900866494
書類名	手続補正書
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成11年 9月 9日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 000000033

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100066980

【住所又は居所】 東京都千代田区神田鍛冶町三丁目7番地 村木ビル8階

【氏名又は名称】 森 哲也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000033]

1. 変更年月日 1990年 8月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

氏 名 旭化成工業株式会社
